

## Молекулярно імпринтовані полімерні мембрани для твердофазової екстракції бісфенолу А

Т.А. Сергєєва<sup>1</sup>, А.В. Сатир<sup>1</sup>, О.В. Пілецька<sup>2</sup>, Л.М. Сергєєва<sup>3</sup>, О.О. Бровко<sup>3</sup>, Г.В. Єльська<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
150, вул. Заболотного, Київ, 03680, Україна

<sup>2</sup>Університет м. Лестер  
Лестер, LE1 7RH, Великобританія

<sup>3</sup>Інститут хімії високомолекулярних сполук НАН України  
48, Харківське шосе, Київ, 02160, Україна

*Комбінуючи методи молекулярного імпринтингу і комп'ютерного моделювання, на основі акрилат-поліуретанових напів-ВПС синтезовано пористі полімерні мембрани для високоселективного попереднього концентрування бісфенолу А (БФА) з розбавлених водних розчинів. Пористі молекулярно імпринтовані (МІП) мембрани отримано методом полімеризації in situ. Значення енергії зв'язування БФА з функціональними мономерами (ФМ) у складі МІП мембран – ітаконовою, метакриловою, 2-акриламідо-2-метил-1-пропансульфоною кислотами та діетиламіноетилметакрилатом становили -40,8; -38,1; -36,7 і -28,1 кКал/Моль відповідно. Виявлено кореляцію між енергією взаємодії БФА-ФМ і здатністю МІП мембран, синтезованих на основі зазначених мономерів, високоселективно розпізнавати БФА. Досліджено залежність адсорбційної здатності МІП мембран від складу аналізованого зразка (рН, концентрація солей у зразку). Для МІП мембран, отриманих із застосуванням ітаконової кислоти, продемонстровано незначне зв'язування близьких структурних аналогів БФА. Застосування МІП мембран у процедурі твердофазової екстракції забезпечило ефективно попереднє концентрування (у 100 разів) розбавлених водних розчинів, що містять БФА.*

**Ключові слова:** молекулярно імпринтовані полімери, мембрани, твердофазова екстракція, бісфенол А.

### Вступ.

Твердофазову екстракцію (ТФЕ) широко застосовують як метод попереднього концентрування, очищення і транспортування зразків у аналітичній хімії, моніторинзі довкілля та харчовій промисловості. Цей метод набув значного поширення завдяки зручності та простоті виконання, потребі мінімальної кількості розчинників з досяганням при цьому високих коефіцієнтів концентрування [1]. Значний інтерес дослідників до ТФЕ зумовлений тим, що аналіз токсичних речовин у зразках з довкілля, біологічних рідинах і культуральних середовищах часто неможливий без їх попередньої обробки, яка займає до 90 % загальної тривалості аналітичної процедури і до 85 % її вартості. Найчастіше як сорбенти для ТФЕ застосовують частинки пористих силікагелів з прищепленими на їхній поверхні гідрофобними алкільними групами. Проте низька селективність таких сорбентів стала причиною пошуку альтернативних підходів, зокрема розробки високоселективних адсорбентів на основі молекулярно імпринтованих полімерів (МІП) [2]. З погляду комерціалізації, застосування МІП як стаціонарної фази у ТФЕ найбільш перспективне,

оскільки це значно здешевлює подальший аналіз за допомогою традиційних аналітичних методів та збільшує його селективність. Порівняно з високоселективними адсорбентами на основі природних рецепторів та антитіл, МІП мають набагато більшу адсорбційну ємність і стабільність при зберіганні, а метод їх синтезу значно простіший [3]. На відміну від імуноадсорбентів, завдяки своїй стабільності в органічних розчинниках картриджі на основі МІП можуть бути легко інтегровані (on-line) у процес високоефективної рідинної або газової хроматографії. Найчастіше у ТФЕ використовують поліпропіленові або скляні картриджі, заповнені сорбентом у вигляді полімерних частинок. Зокрема, запропоновано ряд сорбентів для твердофазової екстракції бісфенолу А (БФА) з розбавлених зразків на основі МІП у вигляді полімерних частинок [4–8].

На жаль, такий формат не дає змоги швидко прокачувати проби великих об'ємів, а самі картриджі швидко забруднюються компонентами зразків, які адсорбуються через неспецифічні взаємодії. З метою подолання частини цих недоліків з'явилися розробки з застосування

сорбентів у вигляді псевдомембран і дисків на основі МПП частинок, синтезованих традиційним способом [9, 10], а також мембранних МПП адсорбентів [11]. З-поміж цих матеріалів застосування МПП мембран у ТФЕ найбільш перспективне завдяки їх високій продуктивності, селективності до цільових аналітів, високій адсорбційній ємності, а також можливості поєднання з інструментальними аналітичними методами.

Зважаючи на це, метою цієї роботи є синтез пористих МПП мембран, селективних до поширеного ксенобіотику БФА, оптимізація їх складу та застосування у процедурі ТФЕ з метою високоселективного попереднього концентрування розбавлених водних розчинів цього аналіту.

### Матеріали і методи.

**Матеріали.** В роботі використовували: 10 % аміак, 4-аміноантипірин, 2-акриламід-2-метил-1-пропансульфонову кислоту (АМПСК), ацетонітрил, БФА, діетиламіноетилметакрилат (ДЕАЕМ), диметилдихлорсилан, диметилформамід (ДМФА), ітаконову кислоту (ІК), катехол, кеталь (2,2-диметокси-2-фенілацетофенон), *o*-крезол, *p*-крезол, 2-нітрофенол, 4-нітрофенол, метакрилову кислоту (МАК), поліетиленгліколь з ММ 20000 (ПЕГ ММ 20000), триетиленглікольдиметакрилат (ТГМ-3), ферриціанід калію, хлорид натрію (Sigma Aldrich, США), резорцинол (Acros Organics, Бельгія). Олігоуретанакрилат (ОУА) був синтезований та люб'язно наданий к. х. н. Матюшовим В. Ф. (Інститут хімії високомолекулярних сполук НАН України). Солі та кислоти було отримано від Sigma-Aldrich (США) та використано без додаткового очищення. Виміри проводили за температури 22–25 °С.

**Синтез МПП мембран методом радикальної полімеризації in situ.** Вибір функціональних мономерів для синтезу МПП проводили за допомогою методу комп'ютерного моделювання. Моделювання взаємодії матричних молекул з потенційними функціональними мономерами здійснювали за допомогою робочої станції Silicon Graphics Octane та програми SYBYL 6.8 (Tripos Inc., США), як описано у роботі [12].

МПП мембрани, здатні до селективного розпізнавання бісфенолу А, синтезували з мономерної суміші, що містила 40 мг БФА (5 % від маси мономерів); ІК / МАК / АМПСК / ДЕАЕМ – функціональні

мономери (молярні співвідношення матриця / функціональний мономер становили 1:1; 1:2; 1:3; 1:4); 400 мкл ДМФА, 120 мг ПЕГ (15 % від маси мономерів), суміш ОУА/ТГМ-3 за співвідношення 15:85, 20 мкл розчину кеталю в ДМФА (200 мг/мл) (0,5 % від маси сітчастого компоненту). Після додавання кожного компоненту суміш інтенсивно перемішували для забезпечення рівномірної полімеризації. Відразу після додавання ініціатора мономерну суміш розміщували між двома скляними пластинами, фіксованими на відстані 60 мкм, що визначається товщиною тефлонових спейсерів. Реакцію радикальної полімеризації ініціювали УФ-опроміненням ( $\lambda=365$  нм, інтенсивність  $3,4 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-2}$ ) за допомогою ультрафіолетової лампи (КФ-4М, Росія) та проводили протягом 30 хв. Контрольні мембрани синтезували з мономерної суміші подібного складу, яка не містила БФА. Матричні молекули, пороутворювачі та компоненти, що не прореагували, екстрагували метанолом в апараті Сокслекта впродовж 8 год., а полімерний пороутворювач – впродовж 8 год. в  $\text{H}_2\text{O}$  ( $T=80$  °С). Після екстракції мембрани висушували за кімнатної температури впродовж 12 год.

**Твердофазова екстракція бісфенолу А на МПП мембранах.** Зразки МПП і контрольних мембран поміщали у фільтраційну комірку Security Guard cartridge system (Phenomenex, Велика Британія)  $d=0,75$  см та приєднували до насоса Beckman 110 В (Beckman, США). Через мембрани фільтрували розчини БФА ( $10^{-4}$  М,  $3\cdot 10^{-4}$  М,  $6\cdot 10^{-4}$  М,  $10^{-3}$  М) зі швидкістю 0,5 мл/хв. Концентрацію БФА у пробах визначали колориметричним методом.

**Спектрофотометричне визначення концентрації БФА** у зразках води ґрунтується на визначенні оптичної густини зразків, що містять бісфенол А, за  $\lambda=540$  нм після проведення кольорової реакції з 4-аміноантипірином. У комірки планшетів для імуноферментного аналізу (ІФА) додавали по 150 мкл розчину БФА відомої концентрації (або по 150 мкл зразків природних/стічних вод), 60 мкл суміші 2 %-вого водного розчину 4-аміноантипірину та 10 %  $\text{NH}_4\text{OH}$  (1:3) і 30 мкл 2 %-вого водного розчину  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ . Оптичну густину визначали за  $\lambda=540$  нм за допомогою мікрофотоколориметра МСС/340 (Epsilon Research Limited, Велика Британія).

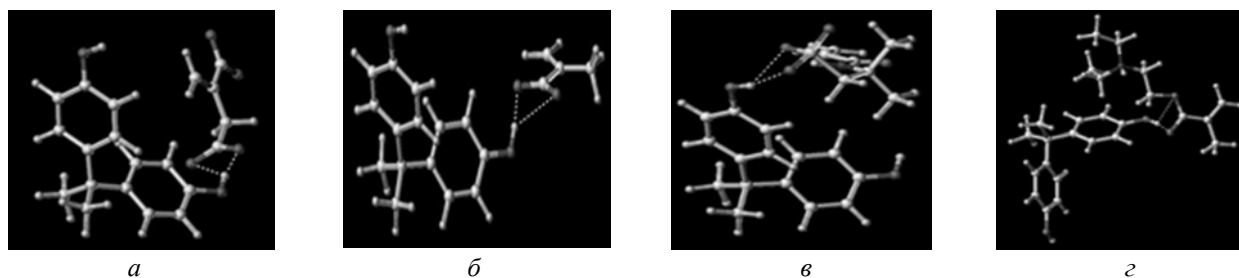


Рис. 1. Можлива структура комплексів БФА з оптимальними для нього функціональними мономерами: ІК (а); МАК (б); АМПСК (е) і ДЕАЕМ (з)

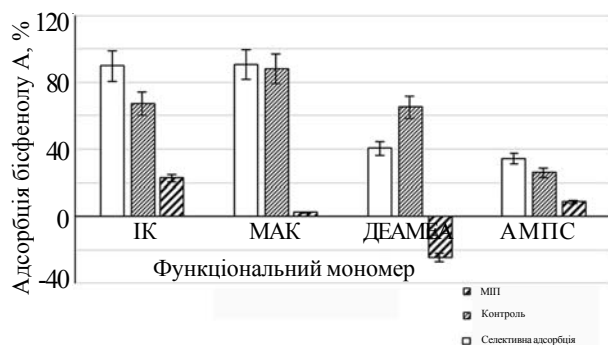


Рис. 2. Залежність селективної адсорбції МПП мембран від типу функціонального мономера, застосованого при синтезі мембран. Співвідношення БФА:функціональний мономер становить 1:1. 5 мл  $10^{-4}$  М розчину БФА фільтрували через мембрани зі швидкістю 0,5 мл/хв

### Результати дослідження та їх обговорення.

Вибір функціонального мономера для синтезу МПП мембран, здатних високоселективно розпізнавати БФА у водних розчинах, проводили, використовуючи метод комп'ютерного моделювання (молекулярної динаміки). З цією метою оцінювали здатність потенційних функціональних мономерів, що традиційно застосовують у молекулярному імпринтингу, формувати стабільні комплекси з БФА. Для синтезу БФА-селективних МПП мембран було відібрано сполуки, здатні забезпечити досить високі енергії взаємодії з БФА за рахунок нековалентних взаємодій, а також завдяки наявності подвійних зв'язків ковалентно включатись у полімерну сітку. Показано, що найвищі енергії взаємодії з БФА (-40,84; -38,07; -36,66 і -28,12 кКал/Моль) були характерні для ітаконової кислоти (ІК), метакрилової кислоти (МАК), 2-акриламідо-2-метилпропансульфонової кислоти (АМПСК) і діетиламіноетилметакрилату (ДЕАЕМ) відповідно. Можливу структуру комплексів БФА з зазначеними функціональними мономерами, які дають уявлення про можливу структуру рецепторних сайтів зв'язування БФА у МПП мембранах, наведено на рис. 1.

З використанням відібраних на етапі комп'ютерного моделювання функціональних мономерів було синтезовано чотири серії МПП і відповідних контрольних мембран з різним вмістом зазначених мономерів (співвідношення БФА:функціональний мономер у вихідних мономерних сумішах становили 1:1, 1:2, 1:3, 1:4). Досліджували здатність МПП мембран, синтезованих на основі ІК, МАК, АМПСК і ДЕАЕМ, селективно адсорбувати БФА з його водних розчинів у ТФЕ. Найвищу адсорбційну здатність виявили мембрани, синтезовані із застосуванням ІК як функціонального мономера (рис. 2). Для подальших експериментів відібрано МПП мембрани, синтезовані з мономерної суміші, що містить ІК як функціональний мономер, співвідношення БФА:ІК у якій становить 1:1, оскільки саме такі мембрани демонстрували високу адсорбційну здатність

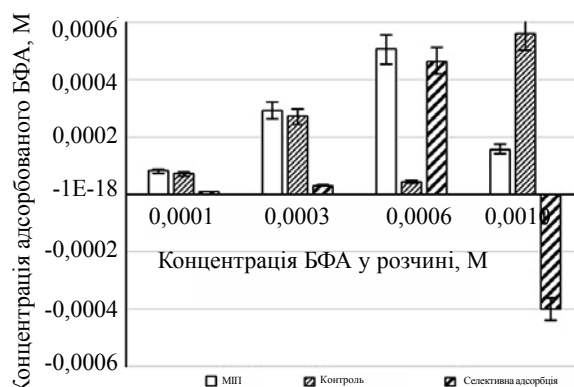


Рис. 3. Залежність селективної адсорбції МПП мембран від концентрації БФА в аналізованому розчині. Використовували розчини БФА ряду концентрацій та мембрани, синтезовані за участі ІК за співвідношення БФА:ІК у вихідній суміші, рівного 1:1. Розчини БФА (5 мл) фільтрували через мембрани зі швидкістю 0,5 мл/хв

разом з найнижчими рівнями неспецифічного зв'язування.

Показано, що БФА-імпринтовані мембрани за оптимізованих умов здатні адсорбувати 85–95 % БФА з аналізованого розчину, тоді як зв'язування БФА з контрольними мембранами незначне (рис. 3).

Серед основних умов середовища, що можуть впливати на ефективність адсорбції БФА на пористих МПП мембранах, рН аналізованого розчину та вміст солей у зразку. Досліджували вплив цих параметрів на здатність МПП мембран, отриманих за участю ІК як функціонального мономера, ефективно сорбувати БФА з аналізованих водних розчинів.

Як відомо, існує сильний вплив значення рН на перебіг хімічних реакцій у водних розчинах, як у модельних зразках, так і у реальних зразках, зокрема природних вод. Значення рН у більшості природних вод коливається в нейтральних межах 6,8–7,2. Для постійного підтримання цього значення існують природні буферні

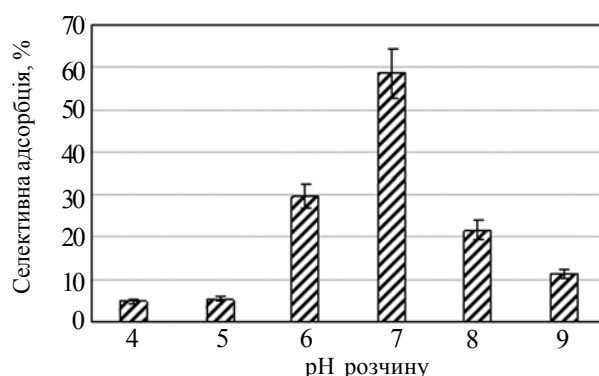


Рис. 4. Залежність селективної адсорбції БФА на МПП мембранах від рН аналізованого розчину. В експерименті  $6 \cdot 10^{-4}$  М БФА в 50 мМ буферних розчинах (5 мл) фільтрували через МПП мембрани зі швидкістю 0,5 мл/хв

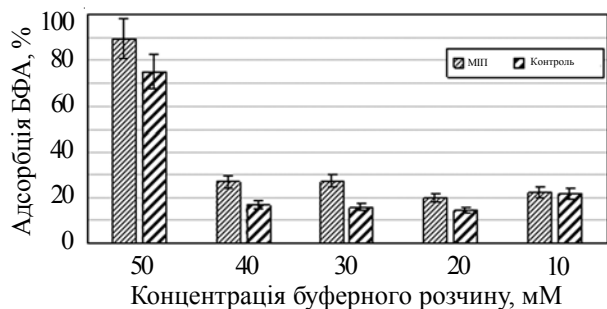


Рис. 5. Залежність величин адсорбції БФА на МІП і контрольних мембранах від концентрації буферного розчину. В експерименті використовували натрій-фосфатний буфер, рН=7; 5 мл буферного розчину, що містить  $6 \cdot 10^{-4}$  М БФА, фільтрували через мембрани зі швидкістю 0,5 мл/хв

системи, ключовими елементами яких зазвичай є карбонати та гідрокарбонати. Вплив рН на ефективність адсорбції БФА МІП мембранами було досліджено із застосуванням таких буферних розчинів: ацетатний буфер (рН=3; рН=4; рН=5); натрій фосфатний буфер (рН=6, рН=7); *трис*-HCl буфер (рН=8; рН=9). Концентрація буферних розчинів становила 50 мМ. Виявили, що найвищі значення селективної адсорбції спостерігаються за рН=7 і концентрації буферного розчину 50 мМ (рис. 4, 5).

Для дослідження селективності біосенсорної системи до БФА через МІП і контрольні мембрани фільтрували розчини БФА та його близьких структурних аналогів – *n*-крезолу, резорцинолу, катехолу, 2-нітрофенолу, 4-нітрофенолу (рис. 6). Різницю кількості аналіту, адсорбованого на МІП і на контрольних мембранах, визначали спектрофотометрично. З рис. 6 видно, що МІП мембрани високоселективні до БФА порівняно з іншими структурно-спорідненими сполуками, що забезпечує їхню придатність до високоселективного попереднього концентрування зразків БФА низької

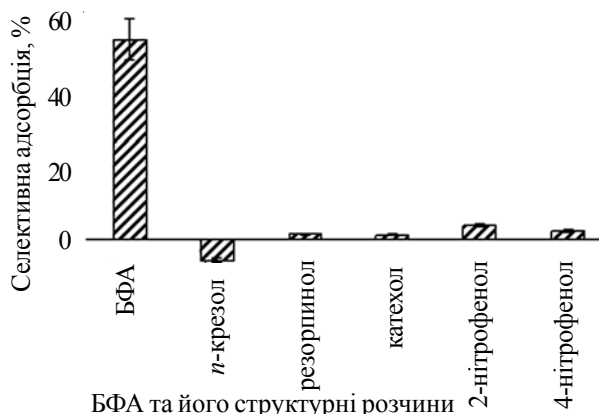


Рис. 6. Селективність МІП мембран, імпринтованих БФА, при розпізнаванні БФА та його близьких структурних аналогів у водних розчинах. У експерименті використовували  $6 \cdot 10^{-4}$  М водні розчини БФА і його аналогів, 5 мл розчинів БФА та його аналогів фільтрували через МІП і контрольні мембрани зі швидкістю 0,5 мл/хв

концентрації.

Запропонований метод твердофазової екстракції розбавлених зразків БФА з використанням МІП мембран як стаціонарної фази забезпечує ефективне попереднє концентрування (у 100 разів) водних розчинів БФА за концентрації  $(1-6) \cdot 10^{-4}$  М.

#### Висновки.

Методом полімеризації *in situ* синтезовано молекулярно імпринтовані полімерні мембрани, здатні селективно адсорбувати БФА з розбавлених водних розчинів, та оптимізовано їх склад. МІП мембрани забезпечують ефективне попереднє концентрування (у 100 разів) водних розчинів БФА за концентрації  $(1-6) \cdot 10^{-4}$  М. При цьому спостерігали незначне зв'язування близьких структурних аналогів БФА, а саме *n*-крезолу, резорцинолу, катехолу, 2-нітрофенолу, 4-нітрофенолу з поверхнею МІП мембран.

## Література

1. Ballesteros-Gomez A., Rubio S., Perez-Bendito D. Analytical methods for the determination of bisphenol A in food // *J. Chromatogr.* – 2009. – **1216**, № 3. – P. 449-469.
2. Sarafraz-Yazdi A., Razavi N. Application of molecularly-imprinted polymers in solid-phase microextraction techniques // *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* – 2015. – **73**, November. – P. 81-90.
3. Ferrer I., Barcelo D. Validation of new solid-phase extraction materials for the selective enrichment of organic contaminants from environmental samples // *Trac-Trend Anal. Chem.* – 1999. – **18**, № 3. – P.180–193.
4. Alexiadou D.K., Maragou N.C., Thomaidis N.S., Theodoridis G.A., and Koupparis M.A. Molecularly imprinted polymers for bisphenol A for HPLC and SPE from water and milk // *J. Sep. Sci.* – 2008. – **31**, № 12. – P. 2272 – 2282.
5. Yang J., Li Y., Wang J., Sun X.L., Cao R., Sun H., Huang C.N., Chen J.P. Molecularly imprinted polymer microspheres prepared by Pickering emulsion polymerization for selective solid-phase extraction of eight bisphenols from human urine samples // *Analytica Chimica Acta.* – 2015. – **872**. – P. 35-45.
6. Zhang X., Zhu D., Huang C., Sun Y., Lee Y.-I. Sensitive detection of bisphenol A in complex samples by in-column molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with capillary electrophoresis // *Microchemical J.* – 2015. – **121**. – P.1-5.
7. Sun X., Wang J., Li Y., Jin J., Yang J., Li F., Shah S.M., Chen J. Highly class-selective solid-phase extraction of bisphenols in milk, sediment and human urine samples

using well-designed dummy molecularly imprinted polymers // *J. of Chromatography A.* – 2014. – **1360.** – P. 9-16.

8. Sun X., Wang J., Li Y., Jin J., Zhang B., Shah S.M., Wang X., Chen J. Highly selective dummy molecularly imprinted polymer as a solid-phase extraction sorbent for five bisphenols in tap and river water // *J. of Chromatography A.* – 2014. – **1343.** – P. 33-41.

9. Suedee R., Chuchome T. T., Kongmark U. Use of molecularly imprinted polymers from a mixture of tetracycline and its degradation products to produce affinity membranes for the removal of tetracycline from water // *J. of Chromatogr.* – 2004. – 811. – P. 191–200.

10. Lehmann M., Brunner H., Tovar G. Selective separations and hydrodynamic studies: a new approach

using molecularly imprinted nanosphere composite membranes // *Desalination.* – 2002. – **149.** – P. 315–321.

11. Sergeyeva T.A., Piletska E.V., Piletsky S.A., Sergeeva L.M., Brovko O.O., El'ska G.V. Data on structure and recognition properties of the template-selective binding sites in semi-IPN-based molecularly imprinted polymer membranes // *Mater. Sci. Eng. C.* – 2008. – **28.** – P. 1472–1479.

12. Sergeeva T.A., Gorbach L.A., Slinchenko O.A., Goncharova L.A., Piletska O.V., Brovko O.O., Sergeeva L.M., El'ska G.V. Towards development of colorimetric test-systems for phenols detection based on computationally-designed molecularly imprinted polymer membranes // *Mater. Sci. Eng. C.* – 2010. – **30.** – P. 431–436.

*Надійшла до редакції 11 лютого 2016 р.*

## Молекулярно импринтированные полимерные мембраны для твердофазной экстракции бисфенола А

Т.А. Сергеева<sup>1</sup>, А.В. Сатур<sup>1</sup>, Е.В. Пілецька<sup>2</sup>, Л.М. Сергеева<sup>3</sup>, О.О. Бровко<sup>3</sup>, А.В. Ельська<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины

150, ул. Заболотного, Киев, 03680, Украина

<sup>2</sup>Университет г. Лестер

Лестер LE1 7RH, Великобритания

<sup>3</sup>Институт химии высокомолекулярных соединений НАН Украины

48, Харьковское шоссе, Киев, 02160, Украина

*Комбинируя методы молекулярного импринтинга и компьютерного моделирования, на основе акрилат-полиуретановых полу-ВПС синтезированы пористые полимерные мембраны для высокоселективного предварительного концентрирования бисфенола А (БФА) из разбавленных водных растворов. Пористые молекулярно импринтированные полимерные (МИП) мембраны получено методом полимеризации in situ. Значения энергии связывания БФА с функциональными мономерами (ФМ) в составе МИП мембран – итаконовой, метакриловой, 2-акриламидо-2-метил-1-пропансульфоновой кислотами и диэтиламиноэтилметакрилатом составили -40,8; -38,1; -36,7 и -28,1 кКал/Моль соответственно. Выявлено корреляцию между энергией взаимодействия БФА-ФМ и способностью МИП мембран, синтезированных на основе указанных мономеров, высокоселективно распознавать БФА. Исследована зависимость адсорбционной способности МИП мембран от состава анализируемого образца (рН, концентрация солей в образце). Для МИП мембран, полученных с применением итаконовой кислоты, продемонстрировано незначительное связывание близких структурных аналогов БФА. Использование МИП мембран в процедуре твердофазной экстракции обеспечило эффективное предварительное концентрирование (в 100 раз) разбавленных водных растворов, содержащих БФА.*

**Ключевые слова:** молекулярно импринтированные полимеры, твердофазная экстракция, мембраны, бисфенол А.

## Molecularly imprinted polymer membranes for solid-phase extraction of bisphenol A

Т.А. Sergeeva<sup>1</sup>, А. V. Satyr<sup>1</sup>, О. V. Piletska<sup>2</sup>, L.M. Sergeeva<sup>3</sup>, О.О. Brovko<sup>3</sup>, А. V. El'skaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine

150, Zabolotnogo str., Kyiv, 03680, Ukraine

<sup>2</sup>University of Leicester

Leicester LE1 7RH, United Kingdom

<sup>3</sup>Institute of Macromolecular Chemistry NAS of Ukraine

48, Kharkivske shose, Kyiv, 02160, Ukraine

*Porous polymeric membranes based on acrylate-polyurethane semi-IPNs for highly-selective preconcentration of bisphenol A from diluted aqueous solutions were synthesized using combination of the methods of molecular imprinting and computational modelling. Porous molecularly imprinted polymer (MIP) membranes were obtained by the method of in situ polymerization. Binding energies between bisphenol A and functional monomers in MIP membranes (itaconic, methacrylic, 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acids and diethylaminoethylmethacrylate) comprised - 40,8; -38,1; -36,7 and -28,1 kCal/M respectively. Correlation between binding energies bisphenol A-functional monomer and ability of MIP membranes synthesized on their basis to recognize bisphenol A selectively was revealed. Dependence of adsorption capability of MIP membranes on a composition of the analyzed sample (pH, salt concentration) was studied. The itaconic acid-based MIP membranes demonstrated insignificant binding of close structural analogues of bisphenol A. Application of the MIP membranes in solid-phase extraction provided effective pre-concentration (up to 100 times) of bisphenol A-containing diluted aqueous solutions.*

**Key words:** molecularly imprinted polymers, membranes, solid-phase extraction, bisphenol A.